大猿叶虫四地理种群的 PCR-RFLP 方法鉴别及遗传多样性分析

魏晓棠[1]，肖海军[2]，白 桦[1]，张京萱[3]，厉 艳[1]，王英超[1]，薛芳森[2]

（1. 山东出入境检验检疫局，山东青岛 266002；2. 江西农业大学昆虫研究所，南昌 330045；
3. 山东烟台出入境检验检疫局，山东烟台 264000）

摘要：为了明确大猿叶虫 *Colaphellus bowringi* Baly 的遗传多样性水平及探索其种群快速鉴定的方法，利用 7 种限制性内切酶对其 4 个地理种群（江西龙南、江西修水、山东泰安、黑龙江哈尔滨）的线粒体 COⅠ基因进行 PCR-RFLP 分析。结果表明：利用 *Ase* Ⅰ，*Mbo* Ⅰ，*Nla* Ⅲ和 *Rsa* Ⅰ在大猿叶虫 4 个地理种群中均没检测到多态性；利用 *Alu* Ⅰ和 *Dra* Ⅰ只检测到种群间的多态性；利用 *Hae* Ⅲ既检测到了种群间的多态性，又在山东种群中检测到种群内多态性。根据酶切图谱，共发现 4 种单倍型，单倍型的特异性可以作为种群鉴别的标志。根据限制性片段共享度，利用 POPGEN 3.2 计算 4 个种群的遗传距离，并利用 MEGA3.1 进行聚类分析，结果显示，大猿叶虫 4 个地理种群间的遗传距离大小与其相对地理距离的远近不相符，其遗传变异程度与其滞育的特征也不相符。据此认为线粒体 COⅠ基因的 PCR-RFLP 分析可以用于大猿叶虫不同地理种群的识别。

关键词：大猿叶虫；地理种群；遗传距离；遗传多样性；线粒体 DNA；COⅠ基因；PCR-RFLP

中图分类号：Q968 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)02-0209-07

Identification and genetic diversity of four geographic populations of *Colaphellus bowringi* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae) in China by PCR-RFLP

WEI Xiao-Tang[1], XIAO Hai-Jun[2], BAI Hua[1], ZHANG Jing-Xuan[3], LI Yan[1], WANG Ying-Chao[1], XUE Fang-Sen[2] (1. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266002, China; 2. Institute of Entomology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: To clarify the levels of genetic diversity and search population rapid identification method of the cabbage beetle *Colaphellus bowringi* Baly, seven restriction endonucleases were used to analyze the amplified products of mtDNA COⅠ gene in four populations of *Colaphellus bowringi*, *i. e.*, Longnan population of Jiangxi, Xiushui population of Jiangxi, Tai'an population of Shandong and Harbin population of Heilongjiang in China. The results showed that *Ase* Ⅰ, *Mbo* Ⅰ, *Nla* Ⅲ and *Rsa* Ⅰ did not produce restriction fragment-length polymorphism among *C. bowringi* populations. The polymorphism was detected among the four populations with *Alu* Ⅰ and *Dra* Ⅰ. However, the restriction fragment-length polymorphism was found either among four populations or within Tai'an population of Shandong with *Hae* Ⅲ. Four haplotypes were found in all individuals. Obviously, the populations could be distinguished with unique haplotypes. According to the proportion of restriction fragments shared, the genetic distances among the four populations were calculated with POPGEN3.2, and a cladogram was produced with MEGA3.1. The results indicated that the genetic distance of *C. bowringi* among four geographic populations did not match with their geographic distance, neither their genetic variance with their diapause variance. We so conclude that PCR-RFLP analysis of mtDNA COⅠ gene can be used to identify different geographic populations of *C. bowringi*.

Key words: *Colaphellus bowringi*; geographic population; genetic distance; genetic diversity; mtDNA; COⅠ gene; PCR-RFLP

基金项目：国家自然科学基金项目(30460074)；江西农业大学自然科学基金项目(2949)

作者简介：魏晓棠，女，博士，1971 年 12 月生，从事植物检疫工作，E-mail：weixiaotang2001@163.com

收稿日期 Received：2009-09-07；接受日期 Accepted：2009-12-20

昆虫的线粒体DNA为双链闭环分子，大小约15.14～16.13 kb，包括13个编码蛋白基因，具有结构简单，无重组、单拷贝，进化速度快、母系遗传且易于扩增等优点，适合于昆虫不同分类阶元的研究（Kruse and Sperling，2002；Schroeder *et al.*，2003）。mtDNA COⅠ基因由于其分布的普遍性、序列和结构的相对保守性已被广泛用于昆虫种群遗传学研究（Sperling *et al.*，1999；Kruse and Sperling，2001；Rondan Dueñas *et al.*，2002）。

限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）是发展最早的分子标记技术之一，其原理是检测DNA在限制性内切酶酶切后形成的特定DNA片段的大小。凡是可以引起酶切位点变异的突变位点（新产生和去除酶切位点）和一段DNA的重组（如插入和缺失造成酶切位点间的长度发生变化）等均可导致RFLP的产生。它具有较高可靠性、来源于自然变异、多样性、共显性、数量性等优点。因此，在昆虫中常被用于昆虫种类的鉴定（Brown *et al.*，1999；Van Bortel *et al.*，2000；Clark *et al.*，2001；林丽莉等，2007）。同时，RFLP分析也以其简便、快速、实用的特点而被普遍应用于种群遗传变异的研究，如利用PCR-RFLP分析鞘翅目萝藦叶甲属 *Chrysochus*（Dobler and Farrell，1999）、双翅目埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（Rondan Dueñas *et al.*，2002）以及鳞翅目舞毒蛾 *Lymantria dispar*（Bogdanowicz *et al.*，1993）、欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*（Marcon *et al.*，1999）和栎绿卷蛾 *Tortrix viridana*（Schroeder and Scholz，2005）的mtDNA COⅠ和COⅡ遗传多样性。

大猿叶虫 *Colaphellus bowringi* Baly属鞘翅目（Coleoptera），叶甲科（Chrysomelidae），无缘甲属 *Colaphellus*，国内分布广泛（章士美和赵泳祥，1996），是许多地区十字花科蔬菜的常发性害虫，成虫和幼虫均可为害，在不用药剂防治的情况下，可将整片菜叶食尽，仅留茎杆。目前国内已对大猿叶虫江西龙南（24°9′N，114°8′E）、江西修水（29°1′N，114°4′E）、山东泰安（36°2′N，117°1′E）和黑龙江哈尔滨（45°8′N，126°6′E）种群的生物学和滞育特性进行了较详细的研究。该虫复杂的滞育特性，导致了生活史的明显分化，不同的温度、光周期以及食料条件均可引起滞育的变异（薛芳森等，2002；Xue *et al.*，2002；Wang *et al.*，2004，2006；董宇奎等，2007；周昱晨等，2007；Yang *et al.*，2007；Lai *et al.*，2008；胡志风等，2008）。江西龙南和修水种群为典型的短日照型昆虫，每年发生1～3代，龙南种群在温度≤18℃时全部个体进入滞育，修水种群在温度≤20℃时全部个体进入滞育；而山东和哈尔滨种群无光周期反应，滞育诱导主要取决于温度，山东种群在温度＜25℃时全部个体进入滞育；哈尔滨种群在温度≤28℃时全部个体进入滞育。山东种群每年发生1～2代，哈尔滨种群每年仅发生1代。大猿叶虫不同地理种群已形成各自的地理适应机制，反映了物种种群对于环境选择压力的反应。

本实验利用约1 200 bp的线粒体COⅠ基因片段为遗传标记，采用PCR-RFLP方法对大猿叶虫4个地理种群进行种群鉴定及分子遗传学的研究，探索其遗传多样性水平及种内快速鉴定的方法，进一步为该虫的预测预报和防治策略的制定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

于2006年4－5月采集大猿叶虫4个地理种群，每个种群随机抽取16个个体，共64个个体（具体采集情况见表1）。所有样品放入无水乙醇中，－20℃保存备用。

表1 大猿叶虫种群样本采集信息

Table 1 Sampling data of *Colaphellus bowringi* populations

种群代码 Population code	采样地点 Sampling locality	纬度 Latitude	经度 Longitude	采样时间 Sampling date	样品数 Sample size
JXL	江西龙南 Longnan，Jiangxi	24°9′N	114°8′E	2006-04	16
JXX	江西修水 Xiushui，Jiangxi	29°1′N	114°4′E	2006-04	16
SDT	山东泰安 Tai'an，Shandong	36°2′N	117°1′E	2006-05	16
HEB	黑龙江哈尔滨 Harbin，Heilongjiang	45°30′N	126°6′E	2006-05	16

1.2　基因组 DNA 的提取

剪取大猿叶虫个体的足和前胸，置于 1.5 mL Eppendorf 管中加入液氮磨碎，利用 Boyce 等(1989)提供的方法，分别提取单个个体的基因组 DNA。

1.3　PCR 扩增

目的基因(图 1)利用昆虫通用引物进行扩增，引物参考 Zhang 和 Hewitt(1996)设计，引物序列为：C1-J-1763：5′-TATAGCATTCCCACGAATAAATAA-3′，TL2-N-3014：5′-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3′。

PCR 反应体积为 25 μL，包括 10 × buffer 2.5 μL，dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL，$MgCl_2$(25 mmol/L) 2 μL，正反向引物(10 pmol/μL)各 1 μL，Taq 酶 (1.5 U) 0.3 μL，模板 1 μL (20(30 ng) DNA，17.2 μL ddH_2O。

PCR 反应条件为：94℃预变性 3 min，然后进行 35 个循环(94℃ 1 min，56℃ 1 min，72℃ 1 min)，72℃延伸 10 min。

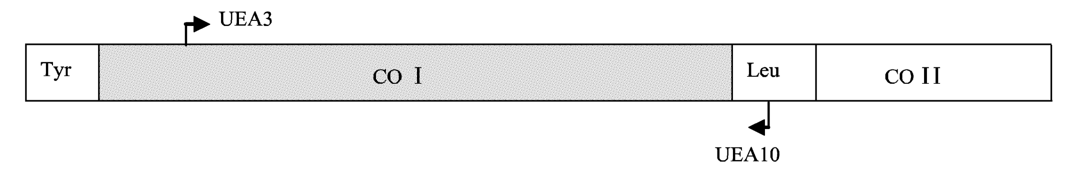


图 1　UEA3 /UEA10 引物及其扩增片段在线粒体 CO Ⅰ上的位置
Fig. 1　Regions of mtDNA amplified and primer UEA3 /UEA10 location

1.4　PCR 产物纯化

用小量胶回收试剂盒(大连宝生物公司)进行回收和纯化。回收时用 1.0% 的琼脂糖凝胶，150 V 电压电泳分离。

1.5　酶切反应

纯化后的 PCR 产物用 16 种限制性内切酶(*Mbo* Ⅰ，*Ssp* Ⅰ，*Dra* Ⅰ，*Nla* Ⅲ，*Xba* Ⅰ，*Tai* Ⅰ，*Mse* Ⅰ，*Taq* Ⅰ，*Rsa* Ⅰ，*Alu* Ⅰ，*Psi* Ⅰ，*Bfa* Ⅰ，*Hae* Ⅲ，*CviA* Ⅲ，*Ase* Ⅰ和 *Hpa* Ⅱ)(内切酶为英国 Biolabs 公司产品，*Tai* Ⅰ由 Fermentas 公司提供)进行酶切筛选。

20 μL 酶切反应体系：6 μL 纯化后的 PCR 产物，2 μL 10 × buffer(100 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl，10 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L DTT，pH 7.9)，1 μL 内切酶(10 U)，11 μL ddH_2O，37℃(*Taq* Ⅰ，*Ase* Ⅰ，*Tai* Ⅰ为 65℃)水浴 10 h。反应中止后，取 5 μL 酶切后反应产物用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳，70 V，90 min，然后用核酸凝胶成像系统观察拍照。筛选出效果较好的酶重复上述实验，建立各种群的 RFLP 指纹图谱。

1.6　数据分析

一种内切酶酶切、电泳后，将电泳谱带的每一条 DNA 条带作为该位点的一个等位基因来处理，每个位点根据电泳迁移位置判别等位基因，并确定个体的基因型，用 A，B，C，D 字母组合来命名。对每一个的 CO Ⅰ区段有酶切位点的几种酶的酶切类型组合后，构成这个体的单倍型(haplotype)。通过 POPGEN3.2 软件计算种群间遗传距离，利用 MEGA3.1 绘制种群聚类树。

2　结果

2.1　线粒体 CO Ⅰ基因酶切片段的检测分析

本实验 PCR 扩增的目的产物是 1 200 bp 左右的 CO Ⅰ基因片段，用 16 种限制性内切酶对纯化后的 PCR 产物进行酶切，经琼脂糖凝胶电泳后筛选出效果较好的 7 种(*Alu* Ⅰ，*Hae* Ⅲ，*Dra* Ⅰ，*Ase* Ⅰ，*Mbo* Ⅰ，*Nla* Ⅲ，*RsaI*)，对大猿叶虫 64 个个体的 PCR 纯化产物进行酶切。7 种内切酶的酶切片段大小见表 2，结果表明：利用 *Ase* Ⅰ，*MboI*，*Nla* Ⅲ和 *Rsa* Ⅰ，在大猿叶虫 4 个地理种群中均没检测到多态性，4 个种群的酶切图谱相同。利用 *Alu* Ⅰ和 *Dra* Ⅰ检测到了种群间的多态性：*Alu* Ⅰ酶切后，哈尔滨种群产生了 4 条带，其他 3 个种群只产生了一条带(图 2)。*Dra* Ⅰ酶切后，哈尔滨种群产生了 3 条带，其他 3 个种群各产生了 5 条带(表 2)。利用 *Hae* Ⅲ既检测到了种群间的多态性，又在泰安种群内检测到多态性：酶切后 4 个种群都产生了 4 个条带，但酶切位点不同，泰安种群 16 个个体中 9 个个体(2，3，5，9 ~ 11，14 ~ 16)与江西龙南种群酶切图谱相同，另外 7 个个体(1，4，6 ~ 8，12，13 个体)出现了一条特异性的 540 bp 左右的带(图 3)。

表 2 大猿叶虫 4 个地理种群酶切片段大小及基因型

Table 2 Restriction fragment length and genotype obtained with seven restriction enzymes for four populations of *Colaphellus bowringi*

限制性内切酶 Restriction enzyme	种群 Population	酶切片段大小 Fragment length	基因型 Genotype
	JXL/JXX/SDT	700	AA
Alu Ⅰ	HEB	260, 425, 700	AB
	JXL	135, 200, 283, 430	AA
	HEB	135, 200, 220, 430	BB
Hae Ⅲ	JXX	135, 175, 220, 430	CC
	SDT	135, 200, 430, 545	DD
		135, 200, 283, 430	AA
Dra Ⅰ	JXL/JXX/SDT	240, 360, 650, 840, 980	AB
	HEB	360, 650, 980	BC
Ase Ⅰ	JXL/JXX/SDT/HEB	209, 504, 610	AA
Mbo Ⅰ	JXL/JXX/SDT/HEB	106, 124, 141, 200, 800	AA
Nla Ⅲ	JXL/JXX/SDT/HEB	104, 496, 630, 770	AB
Rsa Ⅰ	JXL/JXX/SDT/HEB	50, 80, 330, 900	AA

种群代码同表 1 Population code is the same as in Table 1. 下同 The same below.

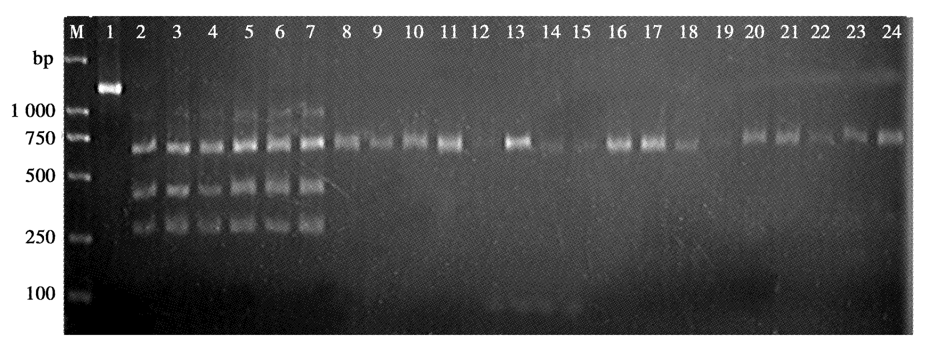


图 2 *Alu* Ⅰ 对大猿叶虫 4 个地理种群酶切的 RFLP 图谱

Fig. 2 RFLP pattern in four populations of *Colaphellus bowringi* digested with the restriction endonuclease *Alu* Ⅰ

M: DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker; 1: PCR 产物 PCR product; 2–7: 黑龙江哈尔滨种群 Harbin population of Helongjiang; 8–13: 江西龙南种群 Longnan population of Jiangxi; 14–19: 山东泰安种群 Tai'an population of Shandong; 20–24: 江西修水种群 Xiushui population of Jiangxi.

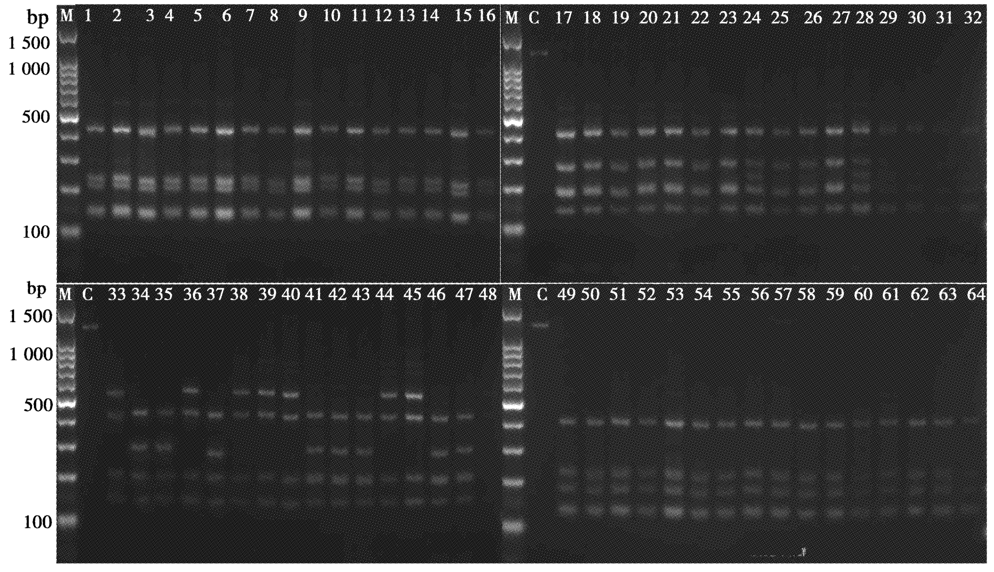


图 3 *Hae* Ⅲ 对大猿叶虫 4 个地理种群酶切的 RFLP 图谱

Fig. 3 RFLP patterns in four populations of *Colaphellus bowringi* digested with the restriction endonuclease *Hae* Ⅲ

M: DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker; C: PCR 产物 PCR products; 1–16: 黑龙江哈尔滨种群 Harbin population of Heilongjiang; 17–32: 江西龙南种群 Longnan population of Jiangxi; 33–48: 山东泰安种群 Tai'an population of Shandong; 48–64: 江西修水种群 Xiushui population of Jiangxi.

2.2　酶切类型及遗传多态性

大猿叶虫 4 个地理种群的 64 个个体共检测到 4 种酶切类型Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ和Ⅳ，5 个多态位点，多态位点比例为 71.43%。各酶切类型在种群中的分布见表 3。Ⅱ，Ⅲ和Ⅳ分别为江西修水、山东泰安和哈尔滨种群所特有，I 为江西龙南种群、山东种群的共享酶切类型。4 个种群中，北方的 2 个种群的多态性高于南方的 2 个种群。

表 3　单倍型在大猿叶虫 4 个种群中的分布

Table 3　Distribution of haplotypes in four population of *Colaphellus bowringi*

种群 Population	单倍型 Haplotype				总计 Total
	I	II	III	IV	
JXL	16	–	–	–	16
JXX	–	16	–	–	16
SDT	9	–	7	–	16
HEB	–	–	–	16	16

2.3　大猿叶虫不同种群间的遗传差异及系统聚类分析

根据不同的酶切结果，利用 POPGENE3.2 软件计算大猿叶虫 4 个地理种群间的遗传距离(表 4)。4 个地理种群中，哈尔滨种群与江西的 2 个种群遗传距离最远，为 0.3300；山东泰安种群与江西龙南种群的遗传距离最近，为 0.0307；江西修水种群与江西龙南种群间的遗传距离大于其与山东泰安种群间的遗传距离。

表 4　大猿叶虫 4 个种群间的遗传距离(下三角)和遗传相似度(上三角)

Table 4　Genetic distance (below diagonal) and Nei's genetic identity (above diagonal) in four geographic populations of *Colaphellus bowringi*

种群 Population	JXL	JXX	SDT	HEB
JXL	–	0.8217	0.9698	0.7189
JXX	0.1963	–	0.8620	0.7189
SDT	0.0307	0.1485	–	0.7542
HEB	0.3300	0.3300	0.2821	–

根据遗传距离值利用 MEGA3.1 软件构建种群间的 UPGMA 系统树(图 4)。可以看出，大猿叶虫 4 个地理种群明显分为二大支，哈尔滨种群单独一支，另外 3 个种群为另一大支，该大支又分为 2 小支，其中江西修水种群为一支，江西龙南种群和山东泰安种群为一支。

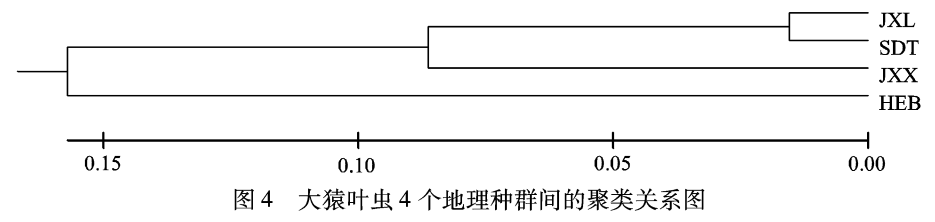


图 4　大猿叶虫 4 个地理种群间的聚类关系图

Fig. 4　The UPGMA phylogenetic tree in four populations of *Colaphellus bowringi*

3　讨论

包括昆虫在内的许多生物类群的细胞核基因组中有类线粒体基因(又称线粒体假基因)的存在(Zhang and Hewitt, 1996)，因此，在 RFLP 图谱中，酶切片断大小之和有时并不等于原扩增片断的大小，这种现象在 RFLP 实验中很正常(Roehrdanz *et al*., 1994)。本实验中，所有个体 PCR 扩增的产物都经过了切胶纯化，扩增片段大小均为 1 200 bp 的目的片段，没有类线粒体基因的存在，酶谱中出现的条带都是酶切的产物，但由于琼脂糖电泳的条件所限，一般小于 80 bp 的条带没有显现，同时也可能有条带重合现象。

3.1　根据不同酶切图谱对大猿叶虫 4 个地理种群的鉴定

昆虫鉴定主要以形态学鉴定为主，但外部形态非常相似的种下阶元的鉴定，利用传统的形态学方法则非常困难。线粒体 DNA 的变异可作为种内鉴定的基础，它比传统形态学更能提供更好的有效标记。线粒体 DNA PCR-RFLP 技术用于昆虫种下阶元的鉴定已有很多成功的报道(Bogdanowicz *et al*., 1993；Cognato *et al*., 1999；Wagener *et al*., 2004；Schroeder and Scholz, 2005)。在本研究所提供的 7 种限制性内切酶中，*Alu* Ⅰ，*Dra* Ⅰ和 *Hae* Ⅲ在大猿叶虫 4 个种群中检测出了遗传多态性，其中哈尔滨种群均产生了区别于其他种群的特异性谱带，所以 3 种酶中的任何一种都能在 4 个种群中区分出哈尔滨种群；此外，*Hae* Ⅲ还在山东泰安种群内检出了

特异性谱带，据此也可以对山东种群进行鉴定。从本实验的 7 种酶切图谱来看，山东泰安种群和江西龙南种群有 6 种酶切图谱相同，*Hae*Ⅲ在 43.75% 的山东泰安种群中检测出特异性条带，其他约 56.25% 的个体酶谱仍与江西龙南种群相同。同一种群内的不同个体间具有高度的遗传同质性，只在山东泰安种群内检测到多态性的存在，但多态性指标仅为 43.75%，说明线粒体 COⅠ基因在大猿叶虫同一种群内具有较高的保守性。

3.2 种群多态性

不同昆虫 mtDNA 的 COⅠ和 COⅡ基因变异程度不同。如利用 PCR-RFLP 标记，萝藦叶甲属 *Chrysochus* 的美国东部种群只发现 1 种单倍型，而在美国西部种群则发现了 5 种单倍型（Dobler and Farrell, 1999）；舞毒蛾 *L. dispar* COⅠ和 COⅡ基因的 PCR-RFLP 分析也显示了中国、日本和美国种群间的分化（Bogdanowicz *et al.*, 1993）；还有在阿根廷 7 个地域的埃及伊蚊 *A. aegypti* 中仅发现 2 个单倍型（Rondan Dueñas *et al.*, 2002）。本实验对 24°9′N ~45°30′N 范围内大猿叶虫的 4 个地理种群 COⅠ基因进行 PCR-RFLP 分析，得到了 4 种单倍型，江西龙南种群、江西修水种群、黑龙江哈尔滨种群各有 1 种单倍型，山东泰安种群内发现 2 种单倍型，其中一种为江西省龙南种群的共享单倍型。

3.3 种群遗传距离和滞育地理变异

大猿叶虫 4 个地理种群 RAPD 分析表明江西龙南种群遗传变异最小，山东泰安种群遗传变异最高。群体间的江西龙南种群和江西修水种群间的遗传距离最小，哈尔滨种群与江西龙南种群间的遗传距离最大，群体遗传距离的大小与其相对地理距离的远近吻合（魏晓棠等, 2009）。本试验种群遗传距离应用 PCR-RFLP 分析显示，大猿叶虫 4 个地理种群明显分为二大支，哈尔滨种群单独一支，另外 3 个种群为另一大支，哈尔滨种群与江西的 2 个种群遗传距离最远；山东泰安种群与江西龙南种群的遗传距离最近，江西修水种群与江西龙南种群间的遗传距离大于其与山东泰安种群间的遗传距离。因此，应用 PCR-RFLP 对 4 个地理种群的遗传差异分析显示种群间的遗传距离与其相对地理距离远近不吻合。

大猿叶虫不同生活史的差异是由不同的滞育特性引起的，随纬度由高到低显示了明显的地理变异（Lai *et al.*, 2008）。发生代数由北至南逐渐增加，哈尔滨种群则一年主要发生 1 代，无夏眠现象；江西龙南、修水和山东泰安种群一年可发生多代，以成虫越夏和越冬。温度对滞育诱导的光周期反应影响表现为 100% 个体进入滞育的上限温度由北至南逐渐降低（哈尔滨种群，≤28℃；泰安种群，<25℃；修水种群，≤20℃；龙南种群，≤18℃）。滞育持续时间在不同地理种群间也差异明显，哈尔滨种群滞育持续时间较短，个体差异较小，当年进入越冬的个体，第二年春季全部出土繁殖；而江西龙南、修水和山东泰安种群滞育越冬的个体，成虫可以分散在入土后的两三年内的春秋两季分散出土繁殖个体差异较大。但是，通过线粒体 DNA COⅠ基因片段对大猿叶虫的 4 个种群进行 RFLP 分析显示哈尔滨种群和山东泰安种群遗传变异程度较高，江西龙南种群和江西修水种群变异程度相对较低。大猿叶虫 4 个种群中，北方的 2 个种群的多态性高于南方的 2 个种群。因此，大猿叶虫 4 个种群的遗传多态性和种群间的遗传距离与种群间滞育的地理变异特征也不相符。

综上所述，线粒体 COⅠ基因的 PCR-RFLP 分析可以用于大猿叶虫不同地理种群的识别，但由于本试验仅选取 4 个地理种群的虫源，以现有 4 个地理种群的 PCR-RFLP 分析结果尚不能判断大猿叶虫的遗传多样性分化规律，因此有必要扩大试验采样范围，以提高其遗传多样性分化判断的准确性。

参 考 文 献（References）

Bogdanowicz SM, Walilner WE, Bell J, Odell TM, Harrison RG, 1993. Asian gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae) in North America: Evidence from molecular data. *Annals of the Entomological Society of America*, 86(6): 710-715.

Boyce TM, Zwick ME, Aquadro CF, 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevil: Size structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123(4): 825-836.

Brown B, Emberson RM, Paterson AM, 1999. Mitochondrial COⅠ and Ⅱ provide useful markers for *Wiseana* (Lepidoptera: Hepialidae) species identification. *Bulletin of Entomological Research*, 89(4): 287-293.

Clark TL, Meinke LJ, Foster JE, 2001. PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase (subunit 1) gene provides diagnostic markers for selected *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bulletin of Entomological Research*, 91(6): 419-427.

Cognato AI, Seybold SJ, Sperling FAH, 1999. Incomplete barriers to mitochondrial gene flow between pheromone races of the North American pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera: Scolytidae). *Proceedings of the Royal Society B*, 266(1 431): 1 843-1 850.

Dobler S, Farrell BD, 1999. Host use evolution in *Chrysochus* milkweed beetles: Evidence from behaviour, population, genetics and phylogeny. *Molecular Ecology*, 8(8): 1 297-1 307.

Dong YK, Zhou YC, Li ZH, Xue FS, 2007. Biological characteristics of the population of *Colaphellus bowringi* in Shandong. *Plant Protection*, 33(2): 70 – 73. ［董宇奎，周昱晨，李照会，薛芳森，2007. 大猿叶虫山东种群生物学特性的研究. 植物保护，33(2): 70 – 73］

Hu ZF, Yu HC, Sun WP, Xue FS, 2008. The developmental duration and biological characteristics of *Colaphellus bowringi* in Harbin. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(6): 909 – 912. ［胡志凤，于洪春，孙文鹏，薛芳森，2008. 哈尔滨地区大猿叶虫发育历期与生物学特性. 昆虫知识，45(6): 909 – 912］

Kruse JJ, Sperling FAH, 2001. Molecular phylogeny within and between species of the *Archips argyrospila* complex (Lepidoptera: Tortricidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94 (2): 163 – 173.

Kruse JJ, Sperling FAH, 2002. Phylogeny of Nearctic species of the *Xylosteana* group of *Archips* Hübner (Lepidoptera: Tortricidae) based on combined analysis of morphological and mitochondrial DNA data sets. *Annals of the Entomological Society of America*, 95 (3): 288 – 301.

Lai XT, Yang D, Wu SH, Zhu XF, Xue FS, 2008. Diapause incidence of progeny in relation to parental geographic origin, host plant and rearing density in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 129(2): 117 – 123.

Lin LL, Wu JJ, Zeng L, Liang GW, Hu XN, Mo RH, 2007. Rapid identification of two species of *Tetradacus* by PCR-RFLP. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(4): 588 – 592. ［林丽莉，吴佳教，曾玲，梁广文，胡学难，莫仁浩，2007. 二种大实蝇的 PCR(RFLP 快速鉴定方法. 昆虫知识，44(4) : 588 – 592］

Marcon PCRG, Taylor DB, Mason CE, Hellmich RL, Siegfried BD, 1999. Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Molecular Biology*, 8(2): 213 – 221.

Roehrdanz RL, Lopez JD, Loera J, Hendricks DE, 1994. Limited mitochondrial DNA Polymorphism in North America populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 856 – 864.

Rondan Dueñas JC, Panzeita-Dutari GM, Blanco A, Gardenal CN, 2002. Restriction fragment-length polymorphism of the mtDNA AT-rich region as a genetic marker in *Agdes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(3): 352 – 358.

Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, Pueschel K, 2003. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Science International*, 132 (1): 76 – 81.

Schroeder H, Scholz F, 2005. Identification of PCR-RFLP haplotypes for assessing genetic variation in the green oak leaf roller *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *Silvae Genetica*, 54 (1): 17 – 24.

Sperling FAH, Raske AG, Otvos IS, 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among populations and host races of *Lambdina fiscellaria* (Gn.) (Lepidoptera: Geometridae). *Insect Molecular Biology*, 8 (1): 97 – 106.

Van Bortel W, Trung HD, Roelants P, Harbach RE, Backeljau T, Coosemans M, 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus s. l.* beyond distinguishing the members of the species complex. *Insect Molecular Biology*, 9(3): 335 – 340.

Wagener B, Reineke A, Lohr B, Zebitz CPW, 2004. A PCR-based approach to distinguish important *Diadegma* species (Hymenoptera: Ichneumonidae) associated with diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bulletin of Entomological Research*, 94(5): 465 – 471.

Wang XP, Xue FS, Ge F, Zhou CA, You LS, 2004. Effects of thermoperiods on diapause induction in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Physiological Entomology*, 29 (5): 419 – 425.

Wang XP, Xue FS, Hua A, Ge F, 2006. Effects of diapause duration on future reproduction in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*: Positive or negative? *Physiological Entomology*, 31(2): 190 – 196.

Wei XT, Xiao HJ, Liu YG, Xue FS, Wang YC, Zhang JX, Bao ZM, 2009. Genetic diversity of four geographical populations of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae) revealed by RAPD. *Acta Entomologica Sinica*, 52 (6): 672 – 678. ［魏晓棠，肖海军，刘云国，薛芳森，王英超，张京萱，包振民，2009. 大猿叶虫四地理种群遗传多样性的 RAPD 分析，昆虫学报，52(6): 672 – 678］

Xue FS, Li AQ, Zhu XF, Gui AL, Jiang PL, Liu XF, 2002. Diversity in life history of the leaf beetle, *Colaphellus bowringi* Baly. *Acta Entomologica Sinica*, 45(4): 494 – 498. ［薛芳森，李爱清，朱杏芬，桂爱礼，蒋佩兰，刘晓芬，2002. 大猿叶虫生活史的研究. 昆虫学报，45(4): 494 – 498］

Xue FS, Spiath HR, Li AQ, Hu A, 2002. The role of photoperiod and temperature in determination of summer and winter diapause in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. *Journal of Insect Physiology*, 48(3): 279 – 286.

Yang D, Lai XT, Sun L, Xue FS, 2007. Parental effects: Physiological age, mating pattern, and diapause duration on diapause incidence of progeny in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Physiology*, 53 (9): 900 – 908.

Zhang DX, Hewitt GM, 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, 6 (2): 143 – 150.

Zhang SM, Zhao YX, 1996. The Geographical Distribution of Agricultural and Forest Insects in China. China Agriculture Press, Beijing. 400 pp. ［章士美，赵泳祥，1996. 中国农林昆虫地理分布. 北京：中国农业出版社. 400 页.］

Zhou YC, Yang ZC, Xue FS, 2007. The effects of host-plants on diapause induction and biology in the Shandong population of the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. *Jiangxi Plant Protection*, 30(2): 50 – 54. ［周昱晨，杨忠成，薛芳森，2007. 食料对大猿叶虫山东种群滞育和生物学特性的影响. 江西植保，30(2): 50 – 54］

（责任编辑：袁德成）